

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-223352  
 (43)Date of publication of application : 06.09.1989

(51)Int.Cl.

G01N 33/543  
 G01N 33/548  
 // A61B 10/00

(21)Application number : 01-002160

(71)Applicant : GENERAL BIOMETRICS INC

(22)Date of filing : 10.01.1989

(72)Inventor : CAROLE ANN GOLDEN  
 ALBERT JEROME WILSON  
 MELREE K BLACK  
 KUTS RICHARD M

(30)Priority

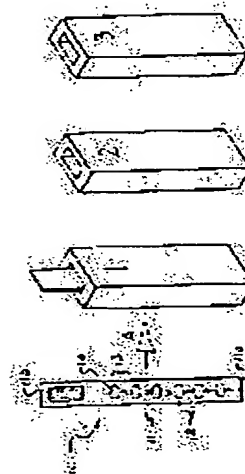
Priority number : 88 142013 Priority date : 11.01.1988 Priority country : US

## (54) IMMUNOASSAY SYSTEM AND METHOD FOR SOLID PHASE ENZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To detect presence of various specific antibodies in a clinical sample in a short time by identifying the presence of antibody simultaneously for some antigens.

CONSTITUTION: The inventive system comprises a porous = trocellulose membrane 14 constituting a stick support 10 while being coupled thermally, under temperature and pressure, with a chemically neutral plastic supporting material 11 having a plurality of openings. The membrane 14 is plotted with a plurality of points of selected and purified antigen which are held thereat. The inventive system further comprises first to third incubation cases 1-3 for receiving the part of membrane 14 of the stick support 10 sequentially into reconstituted immunochemical solution each comprising a tableted immunochemical component, wherein each tablet is mixed with about 0.1MNaCl solution in the case 1-3. Reaction takes place through color changes at the point of specific antigen during incubations performed sequentially in different immunochemical reagents and after cleaning between incubations thus indicating presence of a specific antigen visually.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-223352

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)9月6日

G 01 N 33/543

P-7906-2G

33/548

A-7906-2G

// A 61 B 10/00

D-8119-4C 審査請求 未請求 請求項の数 14 (全14頁)

⑮ 発明の名称 固相酵素免疫検定システムおよび方法

⑯ 特 願 平1-2160

⑰ 出 願 平1(1989)1月10日

優先権主張 ⑱ 1988年1月11日 ⑲ 米国(U S) ⑳ 142,013

㉑ 発 明 者 キヤロル・アン・ゴー  
ルデン

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27244、アラマンス・  
カウンティ、イーロン・カレヅジ、ホワイト・オーク2

㉒ 発 明 者 アルバート・ジェロー  
ム・ウィルスン

アメリカ合衆国ユタ州84119、ソールト・レイク・カウン  
ティ、ウェスト・バレー・シティー、ナンバー195、ウェ  
スト2850・サウス4600

㉓ 出 願 人 ジェネラル・バイオメ  
トリックス・インコー  
ポレイテッド

アメリカ合衆国ユタ州84010、デイビス・カウンティ、バ  
ウンティフル、ビーオー・ボックス308

㉔ 代 理 人 弁理士 大 森 泉  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

固相酵素免疫検定システムおよび方法

2. 特許請求の範囲

1. 臨床試料中の特異抗体の存在を視覚的に  
検出するための固相酵素免疫検定システムであっ  
て、

複数の開口を形成されている化学的に中立なプ  
ラスチック支持部材を有し、

前記プラスチック支持部材に、該支持部材との  
結合部において材料の液体化および流動が生じる  
ような温度および圧力で熱結合され、スティック  
保持体を構成する多孔性ニトロセルロース膜を有  
し、この多孔性ニトロセルロース膜のうちの複数  
の区画は前記プラスチック支持部材の開口を通し  
て露出されていて、複数の選択された精製抗原の  
点のそれぞれを該部分にプロットされて受け入れ、  
かつ保持するようになっており、

選択された精製抗原の各点は前記多孔性のニト  
ロセルロース膜上において前記開口のそれぞれに一

つずつプロットされ、

溶解化された免疫化学成分からそれぞれ再構成  
された免疫化学溶液に前記スティック保持体の前  
記多孔性ニトロセルロース膜端部を順次受け入れ  
てインキュベートするための容器手段を有し、各  
溶解は前記容器手段内に約0.1M NaCl溶  
液とともに加えられて混合されることにより再構  
成され、第一の容器手段は約1滴の少量の血漿、  
血清または全血を加えられる臨床試料系釈液を取  
容するようになっており、第二の容器手段は臨床  
試料中に存在する特異抗体および前記ニトロセル  
ロース膜に点付けされる特定の精製抗原に結合す  
る酵素接合体を取容するようになっており、第三  
の容器は前記特異抗体および前記特定の精製抗原  
の点に結合した前記酵素接合体に相互作用して前  
記点に視覚的な色変化を生じさせる酵素接合体基  
質を取容するようになっており、

インキュベーション間において前記スティック  
保持体の前記多孔性ニトロセルロース膜端部を過  
洗浄するための手段を有する固相酵素免疫検定シ

ステム。

2. 前記開口を通して露出された前記多孔性ニトロセルロース膜の表面に固定された特異精製抗原の点を識別するために前記プラスチック支持部材に各開口の近くにおいて印を形成することを含み、前記開口は間隔を置いて形成されており、

前記スティック保持体は書き込みのためでもある粗い部分からなる指係合部を該支持体の一端部に含む請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

3. 前記プラスチック支持部材と前記多孔性ニトロセルロース膜との熱結合は約1秒±0.2秒の間で30ポンド/in<sup>2</sup>±3ポンド/in<sup>2</sup>の接触圧力、および華氏220度±20度の温度において行われる請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

4. 一列に並べられた6つの開口が前記プラスチック支持部材に長さ方向に間隔を置いて形成され、各開口は多孔性ニトロセルロース膜の区画を露出し、下側の4個の開口はそれぞれ該開口内に露出された前記多孔性ニトロセルロース膜の前

6. 免疫化学試薬の非特異的結合を防ぐために非干渉蛋白質で各開口において前記多孔性膜の区画領域を遮断することをさらに含む請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

7. 試料希釈剤は、錠剤化された前記免疫化学試薬の非特異的相互作用を最小化するように選択された緩衝剤であり、前記第一の容器に導入されて約2mlの0.1M NaCl溶液と混合されることにより該第一の容器において再構成される請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

8. 前記酵素接合体は、非特異的相互作用を最小化するように選択されたものであり、錠剤化され、前記第二の容器に導入されて約2mlの0.1M NaCl溶液と混合されることにより該第二の容器において再構成される請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

9. 前記酵素接合体基質は、前記選択された酵素接合体に反応して、前記抗原の点において検出可能な色変化を生じるものである請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

記区画に特異精製抗原の点を受け入れて固定されるようになっており、残りの2つの上側の開口は該開口内に露出された前記多孔性ニトロセルロース膜の前記区画に陽性および陰性対照の各点をそれぞれ受け入れて固定されるようになっている請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

5. 前記陽性対照は、前記免疫化学溶液中で順次インキュベーションされた後、試験試薬が適正に作用しており、かつ適正な試験手順が行われたことを示すように色変化を表わす精製ヒト免疫グロブリンG(1gG)の点であり、

前記陰性対照は、他の開口に付けられた抗原の点の可溶化/希釈のために適当な緩衝溶液の点か、またはウイルス性抗原産生に使用される感染していない細胞の細胞抽出物のような陰性対照抗原であり、該陰性対照は、試験試薬が適正に作用しておりかつ適正な試験手順が行われていれば、前記免疫化学溶液中で順次インキュベーションされても変化しないようになっている請求項4記載の固相酵素免疫検定システム。

10. 前記多孔性ニトロセルロース膜の前記点を付けられた露出された区画は、インキュベーション間に、0.1M NaCl溶液を収容した湯管手段に前記スティック保持体を装着することによりゆすがれ、前記湯管手段は前記スティック保持体の前記多孔性ニトロセルロース膜部分に湯洗浄を行うように作動される渦流機構手段に支持されるようになっている請求項1記載の固相酵素免疫検定システム。

11. 臨床試料中の特異抗体の存在を視覚的に検出する方法であって、

プラスチック支持部材により支持された多孔性ニトロセルロース膜に特異抗原の点を間隔を置いてプロットして固定する段階を有し、

錠剤化された状態から0.1M NaCl溶液と混合されることによってそれぞれ再構成される選択された免疫化学薬品中で前記抗原の点を付けられた前記多孔性ニトロセルロース膜を次々とインキュベーションする段階を有し、前記抗原の点の第一のインキュベーションは、臨床試料を形成

するべく約1滴の少量の血漿、血清または全血を加えられた緩衝剤からなる試料希釈剤中で行われ、前記希釈剤は所望の化学反応に干渉するような非特異的免疫化学相互作用を最小化しながら前記試料を希釈するように選択されており、

前記抗原の点が固定された前記多孔性ニトロセルロース膜を0.1M NaCl溶液で洗浄する段階を有し、

酵素結合免疫吸着検定(ELISA)ベースの処理を行うに好適な酵素接合体中における前記抗原の点の第二のインキュベーション段階を有し、前記接合体は前記多孔性ニトロセルロース膜上の前記特異抗原の点のあるものに結合した前記臨床試料の抗体に結合するようになっており、

前記抗原の点が固定された前記多孔性ニトロセルロース膜を0.1M NaCl溶液または蒸留水で洗浄する段階を有し、

検出できる点の色変化を生じるように選択された第二のインキュベーションの酵素の酵素接合体基質中における前記抗原の点の第三のインキュベ

ーション段階を有する方法。

陰性対照は、他の開口に付けられた抗原の点の可溶化/希釈のために適当な緩衝溶液の点であり、該陰性対照は、前記再構成された免疫化学溶液中で順次インキュベーションされても変化せず、前記化学薬品が適正に作用しておりかつ適正な試験手順が行われたことを示すようになっている請求項12記載の方法。

14. 非特異的免疫化学結合を防ぐために非干渉蛋白質で各開口において前記多孔性ニトロセルロース膜の区画領域を遮断することをさらに含む請求項13記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 発明の背景

##### 〔発明の分野〕

本発明は、臨床試料中の抗体または抗原の存在を判定するための免疫化学システムおよび方法に関し、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)として知られている処理法に最も密接に関連する。

##### 〔従来の技術〕

免疫学の科学においては、これまで疾病発見の

ーション段階を有する方法。

12. 前記プラスチック支持部材は長さ方向に等間隔に設けられた複数の開口を備えられ、

前記多孔性ニトロセルロース膜が前記支持部材に熱結合され、すなわち前記ニトロセルロース膜の特性を変化することなしに材料が溶接されるようにある時間、温度および圧力が加えられ、前記多孔性ニトロセルロース膜の区画が各前記窓を通して露出され、各前記窓内の前記多孔性膜の区画は、特異精製抗原の点を受け入れて付けられ、そこで乾燥させるようになっている請求項11記載の方法。

13. 前記特異精製抗原の点に加えて、前記多孔性ニトロセルロース膜は前記開口のうちのものにおいて陽性および陰性対照を点付けされ、前記陽性対照は、前記選択された免疫化学溶液中で順次インキュベーションされた後、色変化を示すヒト免疫グロブリンG(IgG)の点であり、前記色変化は前記化学薬品が適正に作用しており、かつ適正な試験手順が行われたことを示し、前記

ために多数の方法が開発されてきており、これらの方法の多くは、抗原は動物の中に導入されたとき検出可能な免疫反応を生ぜしめる物質であるという知識に基いている。その抗原の導入に反応して体は抗体を産生する。この抗体は該抗体の産生を刺激した抗原と結合する能力を有するような蛋白質である。したがって、このような抗原または抗体に対する体の反応は、動物が特定の疾病ないしは疾患に罹っているかまたは罹ったことがあるかを決定することができる。人の血清中に抗体が存在すると確認されれば、その人は特定のタイプの抗原にさらされたことがあると結論できる。本発明者のうちの3人による先行特許出願、特願昭62-203614号、「固相酵素免疫検定法システムおよび処理方法」は、この医学的事実を認識し、疾病検出のための装置および方法を提供している。

上に引用した本発明者の特許出願は、次の11個のカテゴリーにおける臨床実務の抗原および抗体の検出のための試験を明らかにしている。

1) 免疫拡散法、 2) 電気泳動および免疫電気泳動法、 3) 免疫化学および物理化学方法、 4) 放射性免疫検定法、 5) 免疫組織化学的技術、 6) 凝集、 7) 補体結合、 8) 免疫蛍光法、 9) 沈降、 10) ウイルス中和法、および 11) ELISA。この先行特許出願は、抗体または抗原の検出に関するこれまで多数の方法および装置について議論しており、これらはそれぞれ解析のための視覚的記録を生じさせる。これらの引用のうちのあるものと同様に、前記先行特許出願および本出願は好ましい支持体としてニトロセルロース (nitrocellulose) を使用する。

ニトロセルロースの膜は、比較的安く、使用が簡単で、4℃で約12箇月という長い貯蔵寿命を有するという点で、現在最も広く使用されている蛋白質ブロッティングのための転移媒体であるが、支持体に対するニトロセルロース保持体の固定が実際には問題を生じさせることが分った。前記先行特許出願においては、両面テープが好ましいアタッチメント構成として認められた。実際に

は、このような使用から汚染が生じ得ることが分った。本発明は、選択されたニトロセルロース保持体をプラスチックの支持体へ熱ボンディングすることによりこの問題を解決する。前記熱ボンディング・プロセスにおいて、DNAのニトロセルロースへの結合に影響を与えることとなるようにニトロセルロースの物理特性に影響を与えないように、制御された圧力および温度条件下で材料のボンディングないしは溶接が行われる。蛋白質ニトロセルロース結合の正確な性質は未だ充分に分っていないが、疎水性およびイオン相互作用や水素結合を含む幾つかの異なった要因の結果のように思われる。そして、それ故、前記熱ボンディング・プロセスはニトロセルロースへの蛋白質の結合を受け入れる該ニトロセルロースの能力の崩壊なしに前記ニトロセルロース保持体および支持体の溶解および流動を生じさせるものでなければならぬ。この熱ボンディング・プロセスは、本発明において、プラスチック支持体で支持されたニトロセルロースを「スティック保持体」として構

成するために選択され、前記ニトロセルロース保持体はある抗原および対照の点を受け入れてそこで乾燥させる。

上述のように、前記引用された先行発明および本発明の両方は、それぞれ免疫化学技術に分類される蛋白質ドット・ブロッティング・システムに関し、さらに詳しくは酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) に関する。過去数年に渡って、固体保持体への蛋白質ブロッティングは、広範囲な問題を解決するための試験を提供するためにますます使用されて来ている。このような問題は、種々の抗原および抗血清のスクリーニングに加えて、DNAおよびRNA結合蛋白質、糖蛋白質の識別を含む。加うるに、ゲル・マトリックスから取られた分離された蛋白質から蛋白質ブロッティングをするためにニトロセルロース膜を使用することは一般的であった。そして、最近、ニトロセルロースは蛋白質試料を直接該ニトロセルロースに点付け (spotting) するために使用されて来た。この手順は、一般に、蛋白質スポットティングまたは、

本発明におけるように、ドット免疫結合と呼ばれており、この手順は、前述のようなスポットティング手順において蛋白質懸濁液の測定されたアリクウォットが膜の表面に直接付けられ、該膜に吸収されるという点で、従来のゲル・マトリックスからの蛋白質ブロッティングとは異なる。対照的に、ゲル・マトリックスからの蛋白質ブロッティングは、固定化蛋白質を含む分離ゲル・マトリックスをニトロセルロース膜に直接接触して置き、毛管作用によりゲル・マトリックスから蛋白質を転移させることを含み、しばしば数時間から数日という長時間を必要とする。

本発明のドット免疫結合技術は、ある測定された量の蛋白質溶液を点としてニトロセルロース膜の表面に付けることからなる。その後、このような膜は、好ましくは遮断反応を受ける。この遮断反応においては、試験されている蛋白質以外の蛋白質に対する蛋白質結合を阻止するために作用物質が膜に付けられる。遮断後、点付けされた膜は、該膜を抗原-抗体反応状態に置くことによって特

異抗体の検出に使用される。従来の抗体検出手順についての論議は前記先行特許出願、特願昭62-203614号に述べられている。

本発明および前記先行出願は、蛋白質ドット免疫結合技術に向けられている。これらはそれぞれ固定化ニトロセルロース膜を浸漬スティックないしはスティック保持体の形でユニークに使用する。本発明および前記先行出願は、陽性反応を識別する色産物は可溶性でなくて不溶性であるという点で他のELISA法と異なり、かつそれぞれ全血を試験することができる。加えるに、本発明がユニークなことには、本発明のスティック保持体構成は、膜の取り扱いを含めて免疫化学反応がより容易に遂行されるようにする。選択されたニトロセルロース膜を支持体に厳密に制御して熱ボンディングすることにより、完成されたスティック保持体は以前に行われていた粘着ボンディング方法において起こり得た汚染を生じない。さらにユニークなことには、本発明は前記先行発明と同様に、試薬中でのスティック保持体のインキュベーション期

間を、従来の標準的な30分に比較して非常に短くするシステムを提供する。またユニークなことには、本発明は、滅菌化されていて、使用準備のとき再構成されるようになっており、したがって液体試薬よりずっと長い貯蔵寿命を有する試薬の使用を含む。本発明はまた、ユニークな改良された「スティック」ホルダーおよび該ホルダーとともに使用する容器構造を使用する。最後に、本発明のシステムはインキュベーション間において改良された洗浄段階を採用する。

したがって、本発明は、試験を行う医者のオフィスの設備環境において多数の異なる抗原に対する抗体の存在を単一の処理で試験するために使用するための、より有効で信頼できる血清試験システムを提供する。

#### 発明の要約

抗体を検出するための改良された固相酵素免疫検定試験装置および方法における本発明の主な目的は、比較的短い時間のうちに臨床試料中の種々様々な特異抗体の存在を正確にかつ信頼できるよ

うに検出するための装置および方法を提供することである。

本発明の他の目的は、試験装置として、堅い支持体に熱ボンディングによって装着され、複数の特異抗原の点がそこに別々に固定される多孔性膜を提供することであり、前記特異抗原の点は順次行われる異なる免疫化学試薬中におけるインキュベーションおよびこれらのインキュベーション間の洗浄の後、色を変化することにより特異抗体の存在にそれぞれ反応し、それによって特異抗体の存在を視覚的に指示する。

本発明の他の目的は、好ましくは薄いNaCl溶液の添加によって活性化され、インキュベーション段階がその中で順次行われるところの再構成された試薬を構成することとなる長寿命な滅菌化された試薬を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、インキュベーション間の洗浄段階において使用するための渦洗浄(vortex wash)装置を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、医者のオフィスの

設備環境において臨床試料中の複数の特異抗体の存在を短時間で同時に検出するための改良された装置および方法を提供することである。

本発明は臨床試料から幾つかの異なる抗原に対する抗体の存在を同時に検出するための改良された酵素結合ドット・プロット免疫検定法技術である。本発明の改良された装置は、熱ボンディングによってプラスチック支持体に固定される多孔性膜、好ましくはニトロセルロースを含む。このような熱ボンディングにおいては、ある時間に渡るニトロセルロースおよびプラスチックの接触圧力および温度は、ニトロセルロースおよびプラスチックの間に丁度流動を生じさせ、ニトロセルロースの物理特性の変化を生じさせることなく該ニトロセルロースおよびプラスチックの膜を溶接するように厳密に制御される。熱ボンディングの前に、前記支持体は、窓として役立ち、それらを通して前記多孔性膜を露出する穴を開隔において形成される。ボンディングの後、精製された抗原の列が多孔性ニトロセルロース膜上にドット・プロ

ットされて乾燥され、各点（ドット）は前記分離された窓ないしは区画の1つのほぼ中心に位置される。免疫ドットされた固定化膜を装着したスティック保持体は、それ故、浸漬スティックのやり方で使用されるために、一端部において保持されるように形成される。このように構成されて、前記スティック保持体は、臨床試料から前記精製された抗原の点の色変化として抗体を検出するために、薄いNaClによる洗浄を挟んで、所定の試薬に次々と浸される。この検出を行うために、3回の5分間のインキュベーション段階が必要とされる。これらのインキュベーション段階のすべては周囲温度で行われる。前記順次行われるインキュベーションは、錠剤化された試薬をそれぞれ受け入れる3つの別々の容器で行われる。前記試薬は、それぞれ好ましくはNaCl溶液の導入によって活性化される。各容器は次にスティック保持体のニトロセルロース膜端部を挿入され、その後、スティック保持体の膜端部は渦洗浄を受ける。

本発明の方法の実施において、第一の容器は、

スティック保持体の膜端部は、好ましくはアルカリホスファターゼに対する色素産生性基質を、好ましい量および濃度のNaCl溶液を混合することによって再構成される錠剤化形状で収容する最後の第三の容器に浸される。スティック支持体の膜端部をそこに浸されて、前記アルカリホスファターゼ酵素は、結合酵素接合体の部位において、可溶性の色素産生の基質を多孔性ニトロセルロース膜に結合する色のついた不溶性の産物に変える。それによって、前記結合産物はそれぞれニトロセルロース膜表面上に色点として現われる。色点がないことは、臨床試料中に特異抗体がないことを示す。

実際、本発明の改良された酵素結合ドット・プロット検定法の適用は、短時間のうちに実施できる単一の処理で、様々な抗原に対する抗体の存在を確実に、正確に、かつ同時に識別することが分った。

臨床試料において特異抗原に対する抗体を検出するための改良された固相酵素免疫検定試験装置

NaCl溶液および臨床試料からの血漿、血清、または全血のうちのいずれかの1滴と混合することによって活性化ないしは再構成される錠剤形状の臨床試料希釈剤を収容する。前記スティック保持体は5分間のインキュベーション期間の間この希釈剤および試料の中に挿入され、この期間の間に、臨床試料に存在するある抗体が前記抗原の点のうちのあるものに結合する。薄いNaCl溶液を収容したシールされる渦管（vortex tube）にスティック保持体を挿入し、そこで渦形式の洗浄を行った後、スティック保持体は第二の容器に挿入される。この第二の容器は、好ましくは、錠剤化された形で、アルカリホスファターゼを接合された抗ヒト免疫グロブリンGを収容する。スティック保持体の挿入の前に、この錠剤はNaCl溶液を導入し混合することによって再構成される。このインキュベーション段階の間、酵素接合体は前記第一段階の間に臨床試料から吸収された抗体に結合する。同一または新しいNaCl溶液を収容した渦管を使用してもう1回渦洗浄した後、ス

およびその使用方法における本発明の前記目的および特徴並びに他の目的および特徴は、添付図面と関連して本発明が詳細に述べられる以下の記述によってさらに充分に明らかになるであろう。

#### 発明の詳細説明

本発明においては、幾つかの異なる抗原に対する特異抗体を単一の臨床試料から単一の試験方法において同時に検出できる。第2図に示されるようにこの試験方法は、好ましくは、ドット免疫結合された精製された抗原の列を配列されるスティック保持体10を採用する。前記スティック保持体10は第1図に示されるように支持体11を含み、この支持体11は、好ましくは、間隔を置いて形成された丸いかまたは楕円形の窓12の列を有する約40ミル厚の堅いプラスチックからなる長い長方形の薄い小片である。前記窓12は好ましくは13において直角から内方に約15度に斜面を付けられ、下端部11aから間隔を置いて配列される。個々の窓は、該窓に付けられた特定の抗原の点を識別するに好適なようにそれぞれ該窓



の下に文字を付けられて示されている。

多孔性膜14、好ましくはニトロセルロースは、第1図に示されるように熱ボンディングにより支持体11に取り付けられて、スティック保持体10を形成する。この熱ボンディング・プロセスにおいて、支持体11および膜14は、該支持体11および膜14の表面の接合部に種かな溶解を生じさせるように厳密に制御された圧力および温度において短い時間の間圧着される。前記溶解は、転移膜として役立つニトロセルロースの能力に影響を与えることとなるようにニトロセルロース膜の物理特性を崩壊させることなく、該ニトロセルロースおよびプラスチックの層を溶接するに丁度充分である。実際には、好ましい熱ボンディングを提供するために、ニトロセルロース膜およびポリ塩化ビニルの支持体に対して、前記層は、約華氏220度±20度の温度および約30ポンド/1in.<sup>2</sup> ±3ポンド/1in.<sup>2</sup> の圧力を約1秒±0.2秒の間受ける。しかしながら、他の膜材料または異なるプラスチック支持体を使用されるならば、

異なる標本がW、X、YおよびZで識別される下側の窓12のそれぞれの中心に点16として与えられる。その上方、すなわち一番上から二番目の窓はNとラベルされて示されている。この窓は、好ましくは陰性対照を収容する。前記窓12に点付けされるこのような対照は、文字を付けられた窓に点付けされる他のすべての標本の可溶性/希釈のために使用される緩衝溶液からなるか、またはウイルス性の抗原産生に使用される感染していない細胞の細胞抽出物のような陰性対照抗原であり得る。最後に、スティック保持体の端部11b付近のPと識別された一番上の窓は陽性対照を受け入れるために割り当てられることができる。前記陽性対照は、全ての試薬が適正に機能しており、かつ試験手順が適正に行われたことを証明するためのものである。このような対照はまた、第3図に示される3つの反応容器が、試験手順を首尾よく遂行するために望まれる量まで十分に再構成されていることを証明する。実際には、この窓は結晶されたヒト免疫グロブリンG (1gG) の溶液

好ましい熱ボンディング温度および圧力は該特定の材料に対し調整されなければならないであろう。

第1図および2図においてP、N、W、X、YおよびZとして示される文字15が、好ましくは、特定の窓12ないしは該窓内の点を識別するために各窓12の下に位置されて支持体11に形成される。スティック保持体の把持端部11bには、第2図に最もよく示されるように、好ましくは荒い面が備えられて、書き込みまたは同様のものを受け入れるための表面を提供し、肥床試料の識別のために操作者が特定のスティック保持体10にマークするのを可能にする。

多孔性膜14を支持体11に熱ボンディングすることによって一旦スティック保持体10が組み立てられると、多孔性膜のうちの各窓12を通してあらわれる部分は、点16として示されるそれぞれ約1マイクロリットルの抗原標本を点付け(免疫ドット)される。勿論、この開示の範囲内において1マイクロリットル/ドット以外の量も採用され得ることが理解されなければならない。

を点付けされている。勿論、この開示の範囲内において、前述以外の溶液を陽性および陰性対照として使用することもできるし、これらの対照を完全に省略し、PおよびNで示される窓を除去するか、または他の目的のために使用することもできる。実際には、W、X、YおよびZと識別された窓12は、好ましくは試験されるべき抗体の型に対してそれぞれ特異的な種々の精製抗原をそれぞれ点付けされる。勿論、試験されるべき抗体の型の総数が必要な窓12の数を決定する。実際には、下記の例に示されるように、6個の窓(2個は陽性および陰性対照用、他の4個の窓は種々の精製抗原を点付けされる)を有するスティック保持体10が具合よく使用されてきた。

窓12を通してあらわれている多孔性膜14の表面が一旦適切な溶液を点付けされてしまうと、これらの点16は周囲温度において空気乾燥される。このような乾燥は通常数分を必要とするが、より長い乾燥時間も顕著な影響を伴うことなく採用できる。また、周囲温度以外の温度もまた顕著

な影響を伴うことなく採用することができる。

乾態に於いて、スティック保持体10のニトロセルロース膜結合端部11aは、第2図において膜のコートイングを示す中央に孔を開けられたディスク17によって示されるように、遮断され、ないしは覆われる。この遮断は、ニトロセルロースへの免疫化学コンパウンドの非特異的な結合を阻止する非干渉蛋白質または同様のコンパウンドでニトロセルロースをふさぐために行われる。この遮断は最小限度にしか点16に影響しないものであり、かつニトロセルロースのような大抵の多孔性膜が広範囲な蛋白質の非特異的な吸収に対し示す高い親和性を制限するために行われる。本発明においては、この遮断を行うために、スティック保持体10の膜結合端部11aは好ましくは周囲温度で約15分間トリス-食塩水溶液中に脱脂粉乳を含む溶液(10mMトリスに脱脂粉乳5%、pH7.4, 0.9%NaCl)中に浸される。しかしながら、アルブミン、カゼイン、ゼラチン、洗浄剤、高アミノ・コンパウンド、その他の溶液

を含めて、他の遮断溶液もまた使用できる。膜が遮断剤にさらされる時間および温度は、使用される膜および許容できる感受性/干渉の所望レベルによって変わる。さらに、低レベルの感受性が許容できる場合には、遮断は完全に省略できる。

遮断に於いて、スティック保持体10が蒸留水で簡単にゆすがれ、周囲温度において空気乾燥される。特定の試験構成に対して高レベルの感受性が必要とされる場合、緩衝溶液または洗浄剤含有溶液のような他のゆすぎ液を使用することもできる。遮断されたスティック保持体10は、金属箔の袋に包まれ、使用されるまで冷蔵庫温度で貯蔵されるか、またはそれらの予想される使用態様に応じて他の適当な容器に入れられるか、または全く包装されない。ある適用例に対しては、包装された(または包装されない)スティック保持体10は、周囲温度で貯蔵される。さらに、図示されてはいないが、単一の処理で試験できる特異抗体の数を2倍にするために、2つのこのようなスティック保持体10を背中合せの構成で一緒に製造

ないしは配置することができる。

第3図は、容器1、2および3において順次行う第1図および2図のスティック保持体10のインキュベーション段階(インキュベーション間にはゆすぎを伴う)を含む本発明の方法の好ましい実施を示す。臨床試料から特異抗体を抽出するために、上述のようにして用意されたスティック保持体10が容器1、2および3にそれぞれ収容された3つの別々の免疫化学溶液に5分間、周囲温度で順次インキュベートされる。スティック保持体はまた各インキュベーションの間において、好ましくは薄い食塩(NaCl)溶液で、ゆすがれる。第3図に示されている段階は、好ましくは、周囲条件下で行われるが、この図示の範囲内において、インキュベーションの速度を速めたり、遅くしたりするために他のインキュベーション温度および時間を採用することもできる。

本発明の方法は、好ましくは、それぞれ免疫化学溶液を収容する小さなプラスチック容器で行われる。各容器は、該容器に挿入されるスティック

保持体10のニトロセルロース膜結合端部を受け入れる。容器1、2および3は、好ましくは、第5図に示されるように該容器に落とし入れられる免疫化学試薬の錠剤20を受け入れる前は空である。好ましくは、空の乾いた容器に加えられる各錠剤は100mgの錠剤であり、好ましくは2mlの0.1M NaCl溶液で再構成される。スティック保持体の膜端部を容器に没す前に、再懸濁された試薬を適切に混合するべく各錠剤の溶解を確実にするために図示しない使い捨てのプラスチック・ピペットが各容器の内容物を攪拌するのに使用でき、該ピペットは各容器の液体内容物を必要な、数回上下させるように動かされる。

前記試薬錠剤は下記の材料から調製される。この調整において、適当な吸収材料が乾かされ、そして他の化学試薬と混合される。この混合物は錠剤化産業においては一般的な、混合および圧縮モールドリングまたはスタンピングを含む標準的な錠剤化方法により錠剤化される。前記錠剤は下記の量の化学試薬から調製され、これらの処方箋は

それぞれおおよそ各試薬の一個の100mg錠剤を作る。勿論、実際には前記錠剤は好ましくは一回の調合量を大きくして調合され、したがって材料の重量は製造すべき錠剤の数に比例して増加される。加うるに、試薬の処方箋の種々の変更がこの開示の範囲内で可能である。このような変更は、錠剤の分解時間、安定性、コスト、および臨界免疫化学試薬の活性を向上するため採用される。貯蔵寿命、包装、取り扱い容易性および低生産コストのため、凍結乾燥された試薬より錠剤化された免疫化学試薬の方が望ましい。

各容器のための錠剤の好ましい成分は次の通りである。

#### 錠剤化された試料希釈剤

##### 容器1

27mg セルロース  
2.647mg トリスHCl  
8.327mg トリス基剤 (Tris Base)  
40mg 脱脂粉乳  
19mg NaCl

#### 錠剤化された酵素基質

##### 容器3

27.67 mg マンニトール  
33.32 mg セルロース  
0.65 mg ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)  
0.3333 mg 5-ブロム-4-クロロ-3-リン酸-インドリル (BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)  
1.68 mg トリスHCl  
22.8mg トリス基剤 (Tris Base)  
12.64 mg 硫酸マグネシウム  
1mg ステアリン酸マグネシウム

(NBTは0.0088 mlの70%ジメチルホルムアミドに溶解され、そしてセルロースに別個に吸収され、乾燥される。BCIPは0.00667 mlのジメチルホルムアミドに溶解され、そしてマンニトールに別個に吸収され、乾燥される。)

1mg ステアリン酸マグネシウム

#### 錠剤化された検合体

##### 容器2

29.24 mg セルロース  
3.468mg 検合体  
13.696mg トリスHCl  
1.664mg トリス基剤 (Tris Base)  
0.24 mg 硫酸マグネシウム  
46.752mg NaCl  
4mg ウシ血清アルブミン  
1mg ステアリン酸マグネシウム

(検合体は凍結乾燥された検合体、または前記セルロースに別個に吸収され、乾燥された液体検合体でよい。)

第3図に示されるように、3つの容器のうちの、番号1の第1番目の容器は、好ましくは、患者から供給される臨床試料を薄い濃度にするべく希釈するために備えられる臨床試料希釈剤を収容し、かつまた膜への臨床試料の非特異的な結合を最小限とするための遮断物質を備える。容器1に対する好ましい再構成希釈剤は上述の通りである。なお、この開示の範囲内において、例えばトリス食塩水、リン酸緩衝食塩水、洗浄剤を含む溶液等のような他の溶液も、このような溶液が免疫化学試薬の非特異的な相互作用を最小限とするならば、希釈剤として使用することができる。

好ましくは2mlの0.1M NaCl溶液を使用して、第5図に示されるように、希釈剤成分を含む錠剤が再構成された後、血清、血漿または全血のうちのいずれかの1滴が容器1に加えられ、該容器の成分が完全に混合される。実際には、図示しない使い捨てのピペットを使うことによって適正な混合が再び保証される。実際には、非常に

小さい血の滴や、非常に大きい血の滴や、数滴の血を加えても、試験結果に影響を与えないことが分った（平均的な滴はおおよそ45～50マイクロリットルである）。特定の適用例に対し全血の数滴が所望される場合には、凝固開始前に試料が使用され、かつ廃棄されてしまうように、希釈された血液試料を比較的に急いで使用することにより、凝固の問題を避けることができる。またその代りに、凝固阻止剤を試薬の一部として含めるか、または再懸濁希釈剤に加えてもよい。この最初のインキュベーション段階の間に、もし存在すれば、臨床試料からの特異抗体が特異抗原の点に結合する。

上述の段階1は、矢印Aで示されるようにスティック保持体10を臨床試料および試料希釈剤の存在下でインキュベートすることを含む。約5分間のインキュベーションの後、スティック保持体は容器1から取り去られ、簡単にゆすぐれる。このゆすぎは、好ましくは第3図の段階2に示されるように、スティック保持体を渦管19に挿入す

ることにより行われる。この洗浄段階を行うために、第4A図に示されるように、スティック保持体10の上端部は、好ましくはネオプレン、ポリプロピレンまたは同様の材料により形成されたストップバ18の下面に横方向に切られた適当な切り込みに、滑り込ませることによって挟まれる。前記横方向切り込みの両端は、開いて、それらの間にスティック保持体が挟まれるようにスティック保持体を通るようにし、そして旋回戻って該スティック保持体の端部を把持するようになっている。前記切り込みに位置を合わされて接線部18aが示されており、この接線部に対向してスティック保持体の一端部が位置される。このように構成されて、スティック保持体の他端部はネオプレン・ストップバの周囲に実質的に一直線上に並ぶ。第4B図に示されるように、操作者は、好ましくは0.1M NaCl溶液または同様のものであるゆすぎ溶液で部分的に充填された渦洗浄管19に、ストップバ18に装着されたスティック保持体10を合わせ、下降させる。第4C図は、渦

洗浄管19に挿入された、ストップバに装着されたスティック保持体10を示し、ストップバ18はその外周において前記開口端部に対して旋回して該端部をシールしている。スティック保持体10は、第4C図に示されるように、窓12が試験を行う人に向うように位置される。好ましくは、第4A図から第4C図までに示されるように、スティック保持体は各インキュベーション（容器1および2で行われる）間に0.1M NaCl溶液においてゆすぎを受ける。この洗浄段階はまた、任意的に、最後のインキュベーション（容器3で行われる）の後に行うことができる。このような各洗浄において、第4C図に示されるように、スティック保持体10は、一端部が渦管19の壁に当接し、ストップバ18が該スティック保持体をこの位置に保持して渦管の端部をシールするように位置される。渦洗浄はすべてのゆすぎ段階に対して好ましく、今や活性化された点16の許容できる感受性/干渉のレベルを提供するようになっていく。この洗浄は同一の溶液で行うことができる

（ただし、必ずしも同一の溶液で行わなくてもよい）。

容器1および2中のインキュベーション間におけるゆすぎ段階において、操作者は渦管19を渦マシン（vortex machine）内に位置させて垂直に保持し、最高渦速度を使用してスティック保持体10を最低10秒間渦洗浄する。実際には、米国ニューヨーク州ボヘミアのサイエンティフィック・インダストリーズ・インコーポレイテッド、によってフィッシャー・サイエンティフィックのために製造されたボルテックス・ジーニ（Vortex-Genie）、モデルK-550-Gおよびボルテックス・ジーニ-2（Vortex Genie-2）、モデルG560として知られている機械がこの洗浄段階を行うのに効率よく作動することが分った。

前記洗浄段階において、ストップバに装着されたスティック保持体は比較的に振動を免れるようになっていることが重要である。それ故、渦管19で渦洗浄する間、操作者が人さし指をストップバ19の上端部にしっかりと置き、渦管を親指と中指

との間に保持することが役に立つ。もし洗浄中にスティック保持体10が前後に振動し始めたならば、人さし指で緩かな圧力をストップに下向きに作用して前記切り込みの端部を閉じ、それ以上の振動を阻止するようにスティック保持体の端部をクランプする。

所望ならば、ネオプレンのストップ19は、同一の機能、すなわち洗浄処理中に抗原を点付けされたスティック保持体の膜をしっかりと適所に保持するという機能を果たすように使用できるならば、他の同様の装置に置き換えることができる。また、ゆすぎないしは洗浄溶液は、量および成分の両方を変更することができる。しかしながら、種々の濃度が適当であるが、NaClが溶液で使用されることが重要であり、1M~0.1M NaCl溶液が好ましい。このようなNaCl溶液は免疫化学反応の強度を高め、試験完了時に、より強い視覚的な指示を可能にすることが分った。洗浄は、再現性が高度で、速く、免疫化学反応感度を高め、洗浄溶液の量を最小にし、消費者に

ーションは、段階3における第3図の矢印Cの前の図管19で示されるもう1回のゆすぎの後に行われる。好ましくは、この洗浄は前述の洗浄装置と実質的に同様に行われる。この洗浄段階においては、第一回の洗浄に使用された洗浄溶液を再使用してもよいし、新しいNaCl溶液の洗浄液を使用してもよい。また、この二回目の洗浄溶液におけるNaClの存在は重大でないので、NaClは影響なしに省くことができ、蒸留水をその代りに使用できる。しかしながら、最初の洗浄溶液を再使用することが望ましい。何故ならば、そうすれば、包装されるべき試薬の量を最小化し、かつ試験手順を簡便化できるからである。

第二回目の洗浄の後、スティック保持体10は、前記酵素接合体に対する酵素基質を収容する第三の容器に入れられる。前記酵素基質は前記接合体の存在を視覚的に示すように該接合体に反応する。好ましい酵素基質は前述のものであり、錠剤化された形の該酵素基質を約2mlの0.1M NaCl溶液と混合することにより再構成される。

アビールするという点で望ましい。

第一のゆすぎの後（段階2の矢印B）、スティック保持体10は容器2に挿入される。この容器は、好ましくは約2mlの0.1M NaCl溶液と錠剤化された接合体とを混合することにより調製された再構成接合体を好ましくは収容する。好ましい接合体は前述の通りである。しかしながら、他の特異性の接合体もまた本発明の範囲内であることが理解されなければならない。酵素接合体の使用は、前記本発明者のうちの3人の先行特許出願において明らかにされた酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）に基づく処理を実質的に提供する。それ故、ここではさらに議論しない。容器2におけるスティック保持体10のこのインキュベーションの間に、酵素標識接合体は、容器1における最初のインキュベーションで特異抗原の点に結合された臨床試料の抗体に結合する。なお、このインキュベーションの間に、前記接合体はまた前記陽性対照点（好ましくはヒトIgG）に結合する。

容器2内のスティック保持体10のインキュベ

しかしながら、スティック保持体のニトロセルロース膜上の特定の点16に目に見える色変化を生じさせる限りは、この開示の範囲内において他の酵素基質も代わりに使用できることが理解されなければならない。このインキュベーション期間の間に、好ましいとされたアルカリホスファターゼがNB T/BCIP基質と相互作用する。この酵素的相互作用の結果である段階3の産物は、結合酵素接合体の点16の部位でのニトロセルロース膜14上における不可溶性の色の着いた沈降物の産生および沈着である。この沈着および前記膜への該沈着の強い結合は、標円率1.2内においてスティック保持体10上に、ニトロセルロース膜14の白い背景に対比して青紫色の点16を生ずる。このインキュベーションの後、簡単なゆすぎ（これもまたNaCl溶液または蒸留水の洗浄であることが好ましい）を行ってもよい。ただし、必ずしも行わなくてもよい。

第三回目のインキュベーションの後、1つ以上の窓内にあらわれた色点は、臨床試料中に特異抗

版に対する特異抗体が存在することを示し、このような色点が存在しなければ、そのような特異抗体が存在しないことを示す。さらに、試験結果の有効性の検証として、陽性および陰性対照窓PおよびNを調べたとき、陽性対照窓には色点が存在しなければならず、かつ陰性対照窓には検出できる色点が存在してはならない。前記2つの対照に対するそれ以外の結果は試験を無効にする。これは、陽性対照の色変化および陰性対照の色の不変化は、試験時にすべての試験試薬が適正に動いており、かつ試験遂行のために適正な処置が行われたことを示すからである。

前記先行の特許出願において、幾つかの例が詳述され、試験手順の操作および結果が示されている。この手順の有用性および実用性の論議として、前記例および前記先行出願全体が引用される。したがって、ここではそれらの例をこれ以上論議しない。

一つ以上の抗体の存在を試験するための本発明および前記先行出願のドット・プロット・システム

は、従来の血清学的処置に比し幾つかの長所を有することが分った。特に、この試験は、幾つかの抗原に対して抗体の存在を同時に識別することができ、一滴の全血を使用して試験を行うことができ、高度に訓練された人員や高級な機器を必要とせず、20分以内と素早く行うことができ、好ましくは陽性および陰性対照を内蔵し、容易に読み取ることができ、試験されたスティック保持体は永久記録として保存できる。

臨床試料中の抗体を検出するための改良された試験装置およびその使用方法における本発明の好ましい実施例がこれまで示され、かつ説明されてきたが、この開示は例示のためにだけなされており、前記特許請求の範囲内に入る主題から逸脱することなく本開示の範囲内において、前記装置および方法に対する変形が可能であることは明白である。我々は前記特許請求の範囲を我々の発明とみなす。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はプラスチック支持体に並べられたニト

ロセルローズ膜の分解図で、膜と支持体とを結合する装置への制御された熱および圧力の付与をあらわす矢印が示されている；

第2図はスティック保持体を構成するように結合される第1図の膜および支持体の分解斜視図で、支持体は間隔において穴を開けられて示されており、ニトロセルローズ膜の表面は精製された抗原の列を、別々の遮蔽されたドットとして、受け入れて該表面に固定されるように露出されており；

第3図は本発明の方法の実施に伴う段階を、臨床試料中に存在する特定の固定化抗原に対する抗体の存在を各点の色変化によって決定するための第2図のスティック保持体とともに示す概略流れ図；

第4A図から4C図までは洗浄のために洗浄管に装着される第2図のスティック保持体を示し；

第5図は第3図のインキュベーション段階の一つにおいて使用するための容器の図で、封閉化された試薬およびNaCl活性化溶液の導入および

混合を矢印で示している。

1-3-容器、10-スティック保持体、11-プラスチック支持体、11b-スティック保持体の把持端部、12-窓、14-多孔性ニトロセルローズ膜、15-文字、16-抗原の点、18-ストップパ、19-滴管、20-終剤。

特許出願人 ジェネラル・バイオメトリックス・インコーポレイテッド  
代理人 弁理士 大森 泉

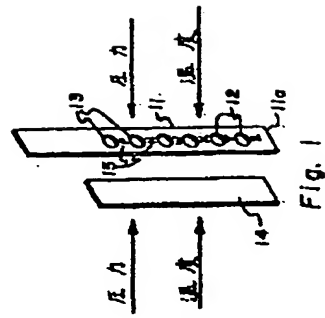


Fig. 1

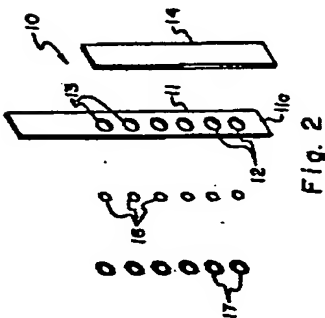


Fig. 2

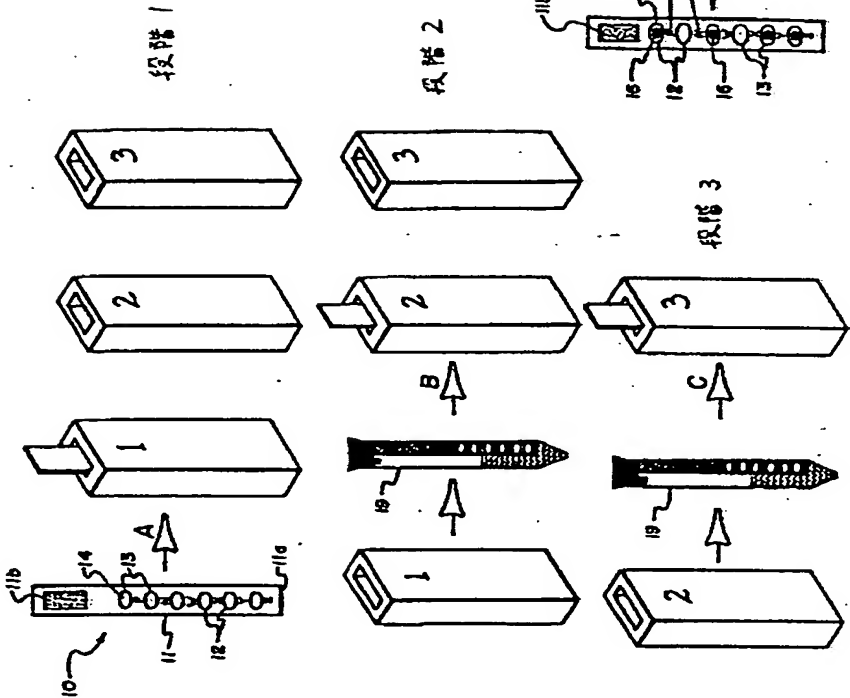


Fig. 3

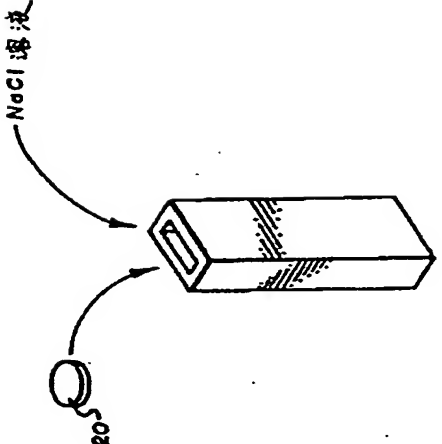


Fig. 5

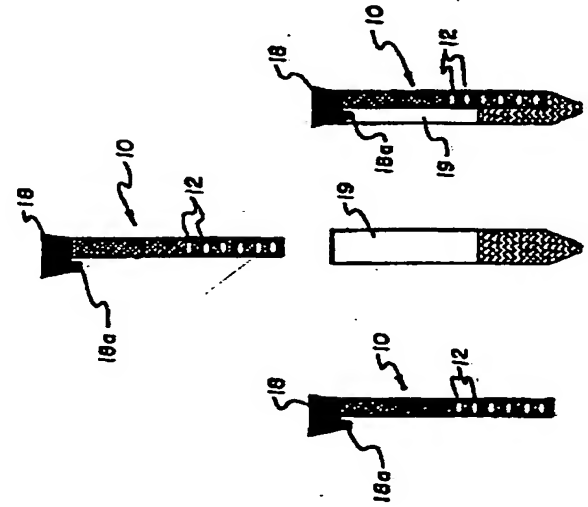


Fig. 4A Fig. 4B Fig. 4C

第1頁の続き

⑦発明者      メルリー・ケイ・ブラ  
                     ツク

⑦発明者      リチャード・エム・ク  
                     ーツ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27244、アラマンズ・  
カウンティ、イーロン・カレッジ、ホワイト・オーク2  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94523、コントラ・コス  
タ・カウンティ、プレゼント・ヒル、スワン・シー・レイ  
ン18